

На правах рукописи

ЗЕЛЕНИХИН ПАВЕЛ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ КАК ИНДУКТОРЫ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ТОКСИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ
КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ОРГАНИЗАЦИИ**

**03.00.07 – микробиология
03.00.04 – биохимия**

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань – 2006

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина.

Научные руководители:	доктор биологических наук, профессор Ильинская Ольга Николаевна, доктор медицинских наук Черепнев Георгий Валентинович
Официальные оппоненты:	доктор ветеринарных наук, профессор Госманов Рауис Госманович кандидат биологических наук, с.н.с. Уразов Наиль Гумерович
Ведущая организация	ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», г. Москва

Защита диссертации состоится «2» марта 2006 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан "31" января 2006г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Н. Аскарова

Актуальность проблемы. С определенной долей условности можно сказать, что многим рибонуклеазам (РНКа́зам) эволюционно присущи токсические свойства. Современные представления о роли и функциях РНКа́з в клетках позволяют рассматривать эти ферменты как перспективную альтернативу традиционным химиотерапевтическим средствам в щадящей терапии злокачественных новообразований. В настоящее время известно значительное количество РНКа́з, обладающих селективным цитотоксическим действием по отношению к клеткам опухолей [Leland, Raines, 2001; Spalletti-Cernia *et al.*, 2004; Ильинская, Макаров, 2005]. Так, например, РНКа́за ооцитов лягушки *Rana pipiens* – онконаза, успешно проходит клинические испытания как противоопухолевое средство в терапии злокачественных новообразований легких. Поиск терапевтически перспективных ферментов среди РНКа́з млекопитающих, связанный с ожидаемыми низкими иммуногенными эффектами таких белков, не оправдывает себя в связи с эволюционно сформировавшейся системой защиты клетки млекопитающих от излишней активности собственных РНКа́з, опосредованной действием специфического цитозольного ингибитора РНКа́з (РИ). Поэтому особое внимание на себя обращают филогенетически далекие от своих аналогов у млекопитающих РНКа́зы амфибий, грибов и микроорганизмов, нечувствительные к действию РИ. Таким образом, отсутствие возможности у бактериальных РНКа́з быть инактивированными в клетках млекопитающих, а также широкие возможности для биоинженерии этих ферментов делает их весьма привлекательными для терапии опухолей. Определение молекулярных детерминант РНКа́з бактерий, ответственных за проявление их цитотоксических свойств по отношению к злокачественным и нормальным клеткам человека, а также изучение их иммуногенной активности позволит обосновать возможность применения микробных РНКа́з и биоинженерных конструкций на их основе в лечении злокачественных новообразований и наметить технологические подходы к решению проблемы получения функционально активных терапевтических белков.

Цель данной работы состояла в оценке цитотоксического действия микробных РНКа́з на злокачественные клетки крови и клетки солидных опухолей, а также характеристике показателей селективности действия, генотоксичности и иммуногенности ферментов, позволяющих экспериментально подтвердить потенциальную возможность использования РНКа́з как средств щадящей противоопухолевой терапии.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать токсические эффекты РНКаз *Bacillus intermedius* (биназы) и *Streptomyces aureofaciens* (РНКазы Sa) и их мутантов при воздействии на клетки бактерий.
2. Охарактеризовать генотоксическую активность микробных РНКаз и их мутантов в прокариотических тест-системах.
3. Исследовать апоптогенное действие РНКазы *Bacillus intermedius* – биназы и ее мутантов со сниженной каталитической активностью на культуры нормальных и злокачественных клеток крови, а также на клетки солидных опухолей животных.
4. Охарактеризовать иммуногенные свойства РНКазы *B. intermedius* по анализу специфических активационных маркеров Т-клеток.
5. На основе полученных данных оценить вклад отдельных молекулярных детерминант, а именно катионности и каталитической активности РНКаз в апоптогенное и цитотоксическое действие ферментов.

Научная новизна. Впервые установлены токсические эффекты по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям высоких концентраций биназы, ее мутанта Lys26Ala и катионных мутантов РНКазы Sa (5K, 7K). Впервые показано генотоксическое действие катионных бактериальных РНКаз в тесте Эймса по индукции мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у бактерий *Salmonella typhimurium* TA 100 и в тесте по индукции SOS-ответа у *Escherichia coli* PQ 37, при этом генотоксические свойства коррелировали с поверхностным зарядом молекулы фермента. В работе впервые с помощью методов проточной цитометрии, электрофореза в пульсирующем поле и дифференциального окрашивания зафиксировано апоптозиндуцирующее действие биназы по отношению к клеткам солидных опухолей (карцинома легких A549) и клеткам миелогенного лейкоза K562 и проведен сравнительный анализ апоптогенной активности РНКазы по отношению к нормальным и опухолевым клеткам. Установлено, что в отношении нетрансформированных аналогов опухолевых клеток фермент не проявляет апоптозиндуцирующих свойств. Впервые охарактеризован решающий вклад в апоптогенность биназы ее каталитической активности, то есть показано, что необходимым условием апоптогенности фермента является расщепление доступной клеточной РНК. Впервые выявлено, что вклад каталитической активности РНКаз в поражение клеток солидных опухолей более значим в сравнении с ролью рибонуклеолитической активности в индукцию апоптоза злокачественных клеток крови. Апоптотические свойства катионных мутантов РНКазы Sa и биназы продемонстрированы в отношении клеточных линий нормальных и *ras*-трансформированных фибробластов, а также эмбриональных клеток почек

человека, нормальных и искусственно экспрессирующих гены кальций-зависимых калиевых каналов, роль которых представляется важной для реализации цитотоксичности РНКаз. Впервые выявлено, что биназа, а также ее мутант Lys26Ala с пониженной каталитической активностью не индуцировали экспрессии специфических маркеров иммунного ответа (CD69 и γ -интерферона) в популяции CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, что свидетельствует об отсутствии у цитотоксичных ферментов свойств индуктора поликлонального Т-клеточного ответа по типу суперантигена.

Практическая значимость. Актуальность проблемы раковых заболеваний заставляет вести постоянный поиск новых препаратов и подходов для лечения злокачественных новообразований, поэтому любая возможность получения новых щадящих средств противоопухолевой терапии, избирательно поражающих злокачественные клетки, имеет несомненную практическую ценность. Настоящая работа особенно важна в связи с тем, что обосновывает индукцию бактериальными РНКазами преимущественной гибели опухолевых клеток путем апоптоза, не нарушающего функционального состояния нормальных тканей организма. В данной работе обоснована возможность получения препаратов с селективным апоптозиндуцирующим действием в отношении малигнизированных клеток на базе каталитически активных катионных микробных РНКаз. Выяснение роли отдельных молекулярных детерминант в токсическом действии РНКаз, в частности весомого вклада зарядовых свойств и каталитической активности молекулы, а также анализ механизма действия этих ферментов позволят разработать подходы к целенаправленному получению высокотоксичных для малигнизированных клеток препаратов нового поколения, альтернативных известным ДНК-повреждающим химиотерапевтическим агентам. Установленное отсутствие у биназы свойств инициатора неспецифического иммунного ответа позволяет в первом приближении обосновать возможность использования этого фермента, а также биоинженерных конструкций на его основе в терапии опухолевых заболеваний.

В ходе экспериментальной работы разработана и опробована оригинальная методика цитометрического определения апоптозиндуцирующего действия соединений, выгодно отличающаяся от классической меньшей стоимостью за счет замены использования дорогостоящих препаратов (аннексина и пропидиума йодида) для цитофлуорометрической фиксации апоптотических изменений клеток на более дешевые аналоги (мероцианин 540 и 7-аминоактиномицин D).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа в течение 2002-2005гг. проводится в соответствии с планом НИР КГУ (№ гос. регистрации 01.2.00 104982

«Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования автора как исполнителя данной тематики поддержаны грантами РФФИ 04-04-49385, NATO LST.CLG.979534, УРФИ 11.01.004, НОКР АН РТ 03-3.10-292, госконтрактами 02.434.11.3020 «Конструирование противоопухолевых препаратов селективного действия на основе микробных рибонуклеаз» и «Центр коллективного пользования КГУ» 02.451.11.7019 (2005-2006гг.), а также программой «Развитие научного потенциала высшей школы РНП.2.1.1.1005. Авторские исследования получили персональную поддержку фонда Палаты депутатов г. Берлина (2003-2004гг.). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Цитометрические исследования и фиксацию апоптических изменений клеток проводили на базе института Медицинской иммунологии Шарите, Берлин, Германия.

Положения, выносимые на защиту.

1. Токсическое и генотоксическое действие РНКаз *B. intermedius* и *S. aureofaciens* на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы зависит от катионных свойств молекулы фермента.
2. Катионные бактериальные РНКазы способны индуцировать апоптические изменения в клетках эукариот. Биназа обладает селективным апоптозиндуцирующим действием в отношении малигнизированных клеток.
3. Биназа не индуцирует поликлональный Т-клеточный ответ.
4. Для проявления РНКазами цитотоксичности они должны сохранять определенный уровень рибонуклеолитической активности и обладать положительным зарядом на поверхности молекулы.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на VI международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды» (Пермь, 2005), XIII международной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005), V конференции Научно-образовательного Центра КГУ «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2005), 79-й Всероссийской студенческой научной конференции, посвященной 1000-летию Казани (2005), 9-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (2005), итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2003 - 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ.

Благодарности: Автор выражает глубокую признательность научным руководителям: доктору биологических наук О.Н. Ильинской и доктору медицинских наук Г.В. Черепневу за поддержку и внимательное

отношение к работе, благодарит доктора химических наук Г.И. Яковлева (ИМБ РАН) за конструирование мутантов рибонуклеазы *B. intermedius*; кандидата химических наук В.А. Митькевича (ИМБ РАН) за определение каталитических параметров бактериальных рибонуклеаз; доктора биологических наук А.А. Макарова (ИМБ РАН) за участие в обсуждении результатов; доктора химических наук Н.К. Пейса (A&M Texas University) за создание и предоставление мутантов рибонуклеазы *S. aureofaciens*; доктора биологических наук Ф. Керна (Institute of Clinical Immunology, Charite) за возможность проведения цитометрии на базе его лаборатории.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, включает 6 таблиц, 28 рисунков. Библиография содержит 221 наименование российских и зарубежных авторов.

Материалы и методы

Ферментные препараты. В работе использовали биназу – гуанилспецифичную РНКазу *Bacillus intermedius* 7P дикого типа (молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI=9.5) и ее мутанты с измененной каталитической активностью Lys²⁶Ala и His¹⁰¹Glu, а также нативную РНКазу Sa (молекулярная масса 10.2 кДа, 96 аминокислотных остатков, pI=3,5) *Streptomyces aureofaciens* и ее мутантные варианты 5K, 7K, 3NQ, 5NQ, Sa^CG₂K₂, K₂^NSa, K₂^N5NQ, различающиеся по величине положительного заряда молекулы и характеру его распределения в молекуле. Все используемые в работе ферменты представлены в табл. 1. Ферменты катализируют эндонуклеолитическое расщепление одноцепочечной РНК в двустадийной реакции, включающей трансэтерификацию с образованием 2'3'-циклофосфата и его последующий гидролиз с образованием 3'-фосфата и представляют собой секретируемые белки. Каталитическая активность биназы и ее мутантов охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [Yakovlev *et al.*, 1994] и высокополимерной дрожжевой РНК [Ilinskaya *et al.*, 1996]. Молекулярные характеристики РНКазы Sa описаны Шау с соавторами [Shaw *et al.*, 2001].

В работе применяли растворы ферментов в буфере PBS (Sigma) в диапазоне концентраций 6-750 мкг/мл.

Бактериальные штаммы. Оценка токсического и генотоксического действия РНКаз на бактерии производилась с использованием штаммов грамотрицательных (*Salmonella typhimurium* TA 100, *Escherichia coli* PQ

37) и грамположительных (*Bacillus subtilis SK*) микроорганизмов коллекции кафедры микробиологии КГУ.

Клеточные культуры. Цитотоксическое и апоптогенное действие РНКаз фиксировали с помощью клеток миелоидного лейкоза человека K562 (Институт медицинской иммунологии Шарите, Берлин, Германия), клеток карциномы легких человека A549 (Американская коллекция клеточных культур, Роквилл, США), фибробластов мыши NIH3T3, фибробластов мыши, трансформированные онкогеном *ras* (*ras*- NIH3T3), клеток эмбриональной почки человека HEK293(CV), клеток эмбриональной почки человека с искусственно внесенными генами кальций-зависимых калиевых каналов HEK_hSK4 из коллекции Института фармакологии университета Гиссена, Гиссен, Германия.

Таблица 1

Используемые в работе группы бактериальных РНКаз и некоторые их характеристики

N	РНКаз	Каталитическая активность, % от активности фермента дикого типа	pI	Заряд ¹
<i>Биназа и ее мутанты с измененной каталитической активностью</i>				
1	Биназа	100	9.5	
2	Lys ²⁶ Ala	28	9.5	
3	His ¹⁰¹ Glu	2.4	9.5	
<i>РНКазы Sa и ее мутанты с увеличенным положительным зарядом</i>				
4	РНКазы Sa	100	3.5	-7
5	5K (D1K, D17K, E41K, D25K, E74K)	14	9.1	+3
6	7K (5K + S31K, D79K)	91	9.6	+6
<i>Мутанты РНКазы Sa с нейтрализованным отрицательным зарядом</i>				
7	3NQ (D1N, D17N, E41Q)	73	4.5	-4
8	5NQ (3NQ + D25N, E74Q)	42	5.7	-2
<i>Мутант с дополнительным положительным зарядом на C-конце</i>				
9	Sa ^C G ₂ K ₂ (Sa-Cys96-Gly- Gly-Lys-Lys на C-конце)	99	4.9	-5
<i>Мутанты с дополнительным положительным зарядом на N-конце</i>				
10	K ₂ ^N Sa (2 Lys на N-конце Sa)	98	4.9	-5
11	K ₂ ^N 5NQ (2 Lys на N-конце 5NQ)	54	8.8	0

¹ Заряд рассчитан для каждого варианта по суммарной модели соединения с учетом pK каждой ионизируемой группы

Методы определения токсического и генотоксического действия РНКаз в прокариотических тест-системах.

1. Оценка токсического действия РНКаз на микроорганизмы. Токсичность ферментных препаратов определяли по выживаемости тестерных штаммов в культуре в присутствии РНКаз, а также (для РНКазы Sa и ее мутантных вариантов) по подавлению активности конститутивного фермента - щелочной фосфатазы в клетках *E. coli PQ 37*, обработанных РНКазами.

2. Тест Эймса на выявление генных мутаций. Мутагенное действие РНКаз оценивали по частоте реверсии ауксотрофного по гистидину штамма *S. typhimurium TA100* к прототрофности. Мутагенную активность рассчитывали по превышению числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования [Фонштейн с соавт., 1985]. Для метаболической активации исследуемых образцов применяли микросомную фракцию печени крыс (ИЭГМ, Пермь).

3. SOS-хромотест. Данный тест позволяет регистрировать мутагенные соединения, способные вызывать индуцибельный мутагенез клетки, и оценить вклад ошибочной репарации в возникновение мутаций под действием исследуемого вещества. Принцип метода основан на измерении индукции SOS-функций клетки по активности фермента β -галактозидазы, чей оперон в индикаторном штамме *E. coli PQ37* введен под контроль гена *sfiA*, входящему в состав SOS-регулона. При экспрессии этого гена начинает вырабатываться β -галактозидаза, дающая при расщеплении субстрата (*o*-нитрофенил- β -галактопиранозид) окрашенный продукт [Quillaret *et al.*, 1982].

Оценка жизнеспособности клеточных культур. Жизнеспособность клеток в культурах оценивали в WST-тесте с использованием коммерческого реагента WST (Rosha Diagnostics, Германия), дающего в качестве восстановленного продукта окрашенную соль тетразолия в реакции с митохондриальными дегидрогеназами живых клеток.

Цитометрическое определение апоптотических клеток. Фиксацию апоптотических изменений клеток крови производили на проточном цитометре FACSCalibur (США) согласно оригинальной методике двойного окрашивания флуорохромными красителями мероцианином 540 (MC540), связывающимся с остатками фосфотидилсерина на внешней стороне мембраны апоптотических клеток [Laakko *et al.*, 2002] и 7-аминоактиномицином D (7-ААД) (Sigma), взаимодействующим с деградирующей ДНК на участках между гуанином и цитозином [Gaforio *et al.*, 2002].

Визуализация апоптических изменений клеток с помощью методов микроскопии.

1. Микроскопическое исследование апоптических изменений клеточной морфологии. Для визуализации типичных морфологических маркеров апоптических процессов применяли классическую окраску препаратов по методу Папенхайма [Costabel, 1994]. Классическую картину вакуолизации клеточных мембран и конденсации хроматина в монослойных культурах фиксировали без красителей.

2. Микроскопия с использованием витального окрашивания флуоресцентными красителями. Для анализа изображений использовали флуоресцентный микроскоп LEICA DMIRE2 (Германия). Визуализацию апоптических изменений митохондрий, подвергнутых обработке РНКазами клеток, проводили с помощью флуоресцентного красителя JC-1 (Bioscarta Europe GmbH, Германия), который существует как мономер в цитозоле (при возбуждении ультрафиолетом имеет зеленый цвет) и аккумулируется в виде агрегатов в митохондриях клеток, окрашиваясь красным [Quiniou *et al.*, 2005]. Возрастание уровня внутриклеточного кальция, являющееся одним из ранних маркеров процесса апоптоза, фиксировали с помощью флуоресцентного агента FURA-2 (Sigma), представляющего собой селективный хелатор кальция, изменяющий окраску при возбуждении ультрафиолетом в зависимости от возрастания концентрации кальция от голубой до красной. Для визуализации апоптических ядер клеток солидных опухолей фиксированные метанолом клетки окрашивали бис-бензимином 33358 (Hoechst).

Выявление двойных разрывов ДНК методом электрофореза в пульсирующем поле. Апоптические изменения клеток солидных опухолей (A549) под действием РНКаза выявляли методом детектирования фрагментации ДНК с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле. Электрофорез проводили согласно стандартным протоколам с использованием системы BioRad CHEF-DRIII [Vock *et al.*, 1999]. В качестве маркеров использовали рестрикционные фрагменты ДНК *Saccharomyces cerevisiae* и фага λ .

Исследование индукции неспецифического иммунного ответа. Возможность индукции неспецифического иммунного ответа под действием биназы определяли на проточном цитометре FACSCalibur (США) по уровню экспрессии антигена CD69 и γ -интерферона CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитами, выделенными из периферической крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте фиколверографина (Pharmacia, Швеция) по стандартной методике [Boyum, 1968].

Результаты и их обсуждение

Токсические и генотоксические эффекты бактериальных РНКаза

Установлено, что биназа и ее мутантные варианты Lys²⁶Ala и His¹⁰¹Glu не обладали токсичностью по отношению к *S. typhimurium*

TA100 и *B. subtilis* ни в одной из исследованных концентраций (10-500мкг/мл). Значимые токсические эффекты РНКазы Sa и ее катионных модификаций проявились лишь в наивысшей из протестированных концентраций ферментов – 500мкг/мл. При этом наибольшую токсичность в отношении тестерного штамма *E. coli PQ37* проявил катионный вариант 7К РНКазы Sa, несущий максимальный положительный заряд на молекуле по сравнению с другими исследованными мутантными формами РНКаз. Активность щелочной фосфатазы, отражающая жизнеспособность клеток, в пробе, инкубированной с РНКазой 7К, составляла 36% от контрольной. Полученные данные подчеркивают важность катионных свойств молекулы фермента в реализации ее цитотоксического потенциала и подтверждают известную для эукариот зависимость токсических эффектов РНКазы Sa от величины положительного заряда ее поверхности.

Способность индуцировать генные мутации у бактерий в тесте Эймса оценена для двух групп мутантов РНКазы Sa, а именно с нейтрализованным отрицательным зарядом молекулы (3NQ и 5NQ) и с дополнительным положительно заряженным «хвостом» из двух остатков лизина на N-конце молекулы (K_2^N Sa и K_2^N 5NQ). Для данных мутантов РНКазы Sa не выявлено мутагенных эффектов ни в одной из исследованных концентраций. Аналогичный результат получен при исследовании мутагенной активности ферментов на основе РНКазы Sa в варианте теста с метаболической активацией микросомной фракцией печени крыс.

Для более детального анализа генотоксических эффектов биназа, ее мутантные варианты с пониженной каталитической активностью - $Lys^{26}Ala$, и $His^{101}Glu$, а также РНКазы Sa и ее мутанты 5К, 7К, 3NQ, 5NQ, $Sa^C G_2 K_2$, K_2^N Sa, K_2^N 5NQ, различающиеся по величине положительного заряда молекулы и характеру его распределения, были исследованы в SOS-хромотесте как возможные индукторы SOS-ответа клетки. Достоверная индукция SOS-ответа установлена только для биназы и катионных мутантов РНКазы Sa 5К и 7К в максимальной из исследованных концентраций (500мкг/мл) (рис. 1). Для других исследованных ферментов значение фактора индукции SOS-ответа не превышало порогового. Это позволило сделать вывод об отсутствии SOS-индуцирующего действия мутантов биназы с пониженной каталитической активностью, а также РНКазы Sa и ее вариантов с увеличенным положительным зарядом 3NQ, 5NQ, $Sa^C G_2 K_2$, K_2^N Sa, K_2^N 5NQ. Отметим, что заряд этих мутантов не достигает собственно положительных значений, как у мутантов 5К и 7К (табл. 1).

Таким образом, в результате сравнения генотоксического действия РНКаз можно заключить, что каталитическая активность является важной молекулярной детерминантой SOS-индуцирующей активности ферментов. Однако, по всей видимости, роль положительного заряда молекулы фермента в формировании его SOS-индуцирующего действия еще более выражена. Из всех катионных мутантов РНКазы Sa способностью

вызывать повреждения генетического материала, приводящие к активации системы SOS-репарации, обладали РНКазы 5К и 7К, несущие наибольший положительный заряд на поверхности. Особенно интересно, что мутант 5К сохранил лишь 14% рибонуклеолитической активности РНКазы Sa дикого типа (табл. 1), но обладал высокой способностью к индукции SOS-функций клетки.

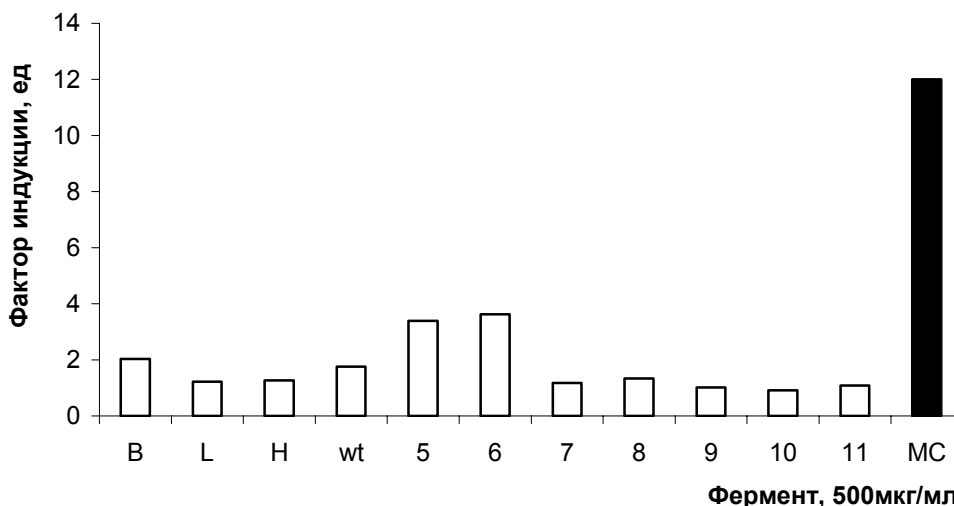


Рис. 1. SOS-индуцирующая активность бактериальных РНКаз. В – биназа, L - Lys²⁶Ala, H - His¹⁰¹Glu, wt – нативная РНКазы Sa; 5 - 5К; 6 - 7К; 7 - 3NQ; 8 - 5NQ; 9 - Sa^CG₂K₂; 10 - K₂^NSa; 11 - K₂^N5NQ – катионные мутантные варианты, MC – митоминин С (2мкг/мл).

Апоптозиндуцирующее действие рибонуклеаз на нормальные и опухолевые клетки крови

Цитометрическое исследование апоптогенных эффектов биназы и ее мутанта Lys²⁶Ala с пониженной каталитической активностью проводили на культурах клеток миелогенного лейкоза человека K562 и лимфоцитах, выделенных из периферической крови здоровых доноров после инкубации с РНКазой в течение 48ч. Типичная цитометрическая картина распределения клеток миелоидного лейкоза в результате воздействия апоптогена представлена на рис. 2.

Установлено, что биназа проявляла концентрационнозависимое апоптозиндуцирующее действие по отношению к клеткам миелогенного лейкоза K562 и ингибировала их пролиферацию в диапазоне доз 30-750мкг/мл. Цитотоксическое действие биназы приводило к снижению общего количества клеток (рис. 3) при инкубации с ферментом (до 42% по сравнению с контролем при концентрации фермента 750мкг/мл). Доля жизнеспособных неапоптотических клеток также уменьшалась при инкубации культур с биназой. Доля жизнеспособных клеток в культуре снижалась под действием биназы (750мкг/мл) до 56% от общего количества клеток, тогда как в контрольном варианте без обработки ферментом жизнеспособные клетки составляли 94% популяции (рис. 3).

С увеличением концентрации фермента в культуре повышалось количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза (рис. 3). Увеличение доли как ранне-, так и позднеапоптотических клеток имело концентрационнозависимый характер и достигало своего максимума при концентрации РНКазы 750мкг/мл: ранне- и позднеапоптотические клетки составляли 31% и 13% против 5% и 1% в контроле, соответственно.

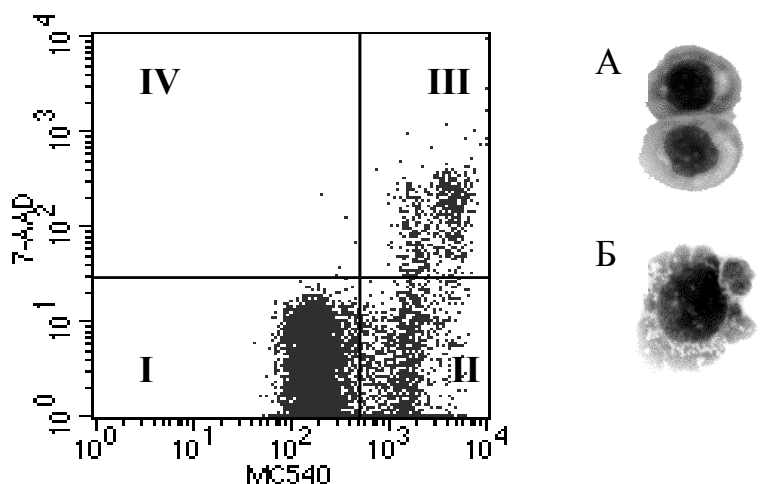


Рис. 2. Цитометрическое распределение клеток K562 по популяциям при двойном окрашивании MC540 и 7-AAD: квадрант I – нормальные клетки (А), II – клетки в раннем апоптозе, III – клетки в позднем апоптозе (Б), IV – некротические клетки.

Для оценки роли положительного заряда молекулы в индукции программируемой клеточной гибели использовали белок лизоцим, имеющий сходную с биназой молекулярную массу (14 кДа) и высокий положительный заряд (pI=11), но не обладающий рибонуклеолитической активностью. В диапазоне исследованных концентраций (от 6 до 750мкг/мл) лизоцим не проявил ни апоптогенных, ни ингибирующих пролиферацию свойств (рис. 3). Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что фактор катионности не может считаться единственно достаточным для индукции белком апоптоза, и апоптогенное, как и антипролиферативное, действие биназы зависит от специфических молекулярных детерминант этого фермента, в частности, от рибонуклеолитической активности.

Апоптогенное действие биназы и ее мутанта Lys²⁶Ala с 30% каталитической активностью на клетки K562 не имело статистически достоверных различий, что характеризует этот уровень рибонуклеолитической активности как достаточный для индукции апоптоза клеток миелоидного лейкоза.

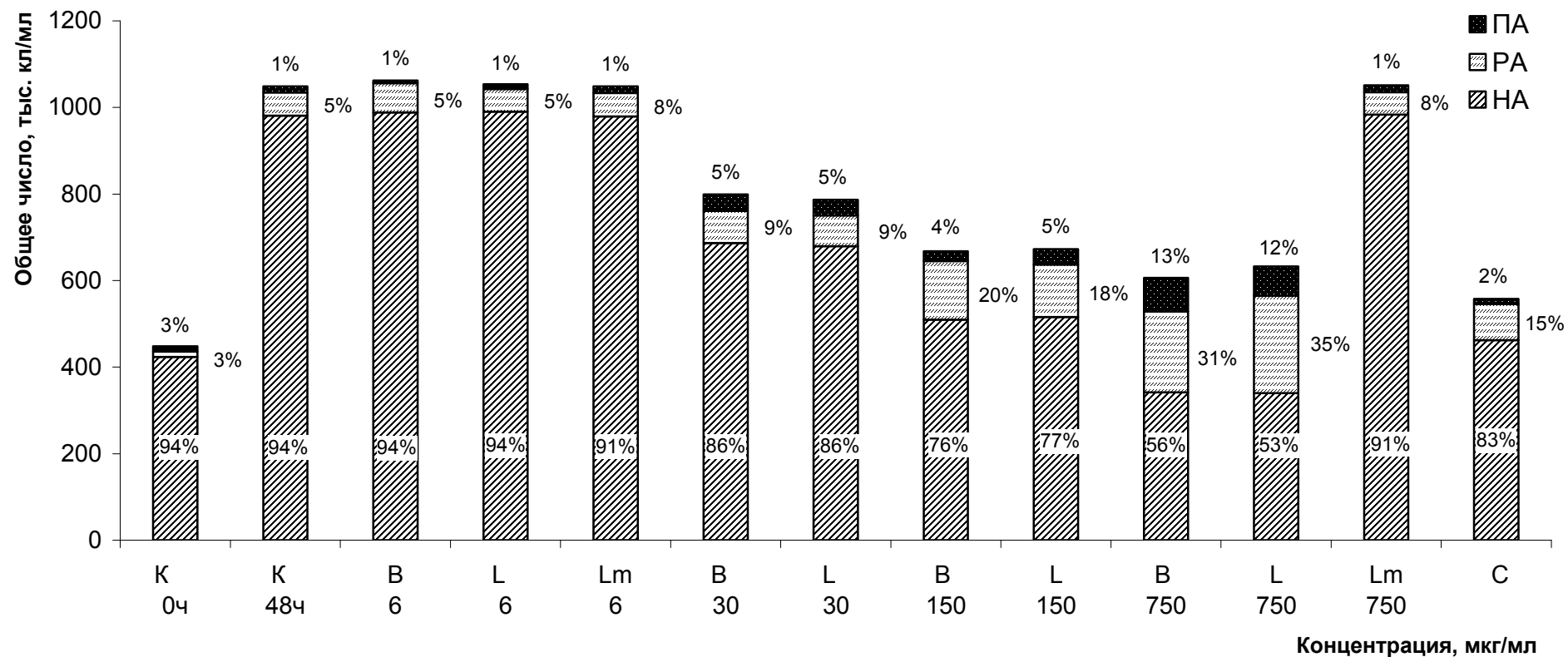


Рис. 3. Распределение клеток K562, обработанных РНКазами в течение 48ч, по популяциям, отражающим стадийность апоптоза (ПА – поздний, РА – ранний апоптоз, НА – неапоптотические клетки). Варианты: К – контрольные необработанные клетки в начале эксперимента и спустя 48ч культивирования; В – обработка биназой дикого типа; Л – обработка мутантом Lys²⁶Ala; Lm – лизоцимом; С – камптотецином.

Необходимо отметить, что апоптозиндуцирующее действие биназы на клетки K562 было значительным и превышало таковое для классического индуктора апоптоза – камптотецина.

Чтобы оценить возможность индукции цитотоксических эффектов биназы в нормальных клетках человека, было проведено исследование воздействия фермента на лимфоциты, выделенные из крови здоровых доноров (рис. 4). Во всем диапазоне исследованных концентраций (6-750мкг/мл) биназа не оказала влияния на жизнеспособность клеток. Доля ранне- и позднеапоптотических клеток при инкубировании лимфоцитов с ферментом соответствовало таковому в контроле (10% и 1%, соответственно), в то время как в варианте с камптотецином доля клеток в состоянии раннего апоптоза достигала 30%.

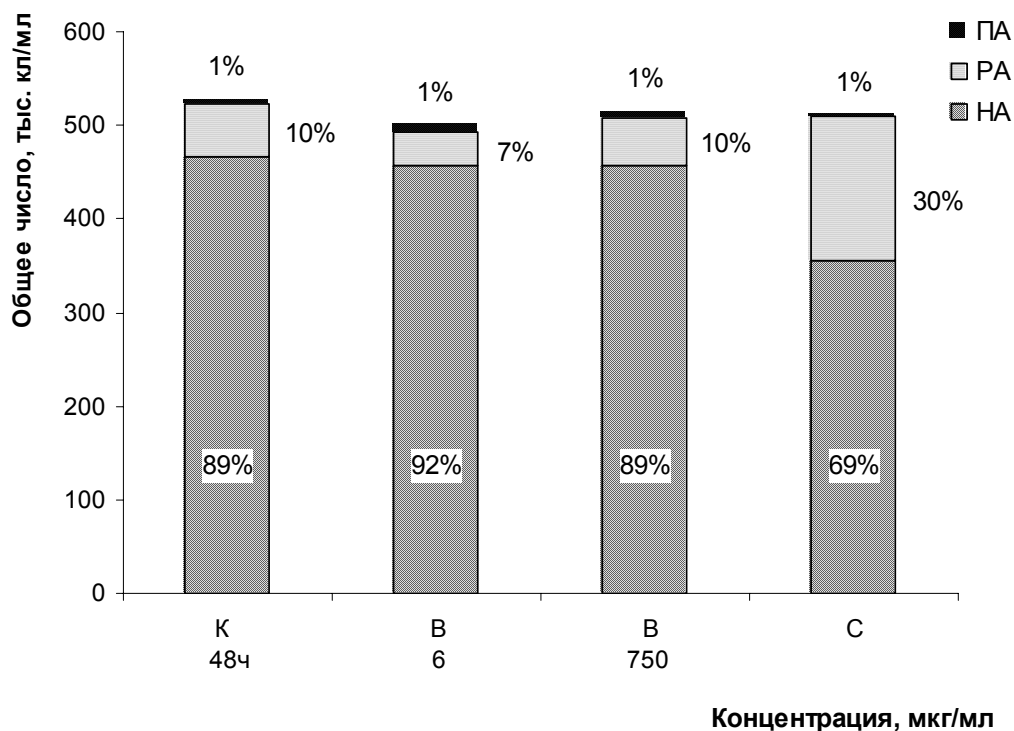


Рис. 4. Распределение лимфоцитов, обработанных биназой в течение 48ч, по популяциям, отражающим стадийность апоптоза (ПА – поздний, РА – ранний апоптоз, НА – неапоптотические клетки). Варианты: К – контрольные необработанные клетки спустя 48ч культивирования; В – обработка биназой дикого типа; С – камптотецином (50 мМ).

Апоптозиндуцирующее действие рибонуклеаз на клетки солидных опухолей

Результаты сравнения токсического действия биназы и ее мутантов по отношению к клеткам карциномы легких A549 после 72ч роста в присутствии РНКаз (500мкг/мл) представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние биназы, мутантов Lys²⁶Ala, His¹⁰¹Glu на рост и развитие клеток A549

РНКаза	Число тыс/чашку	клеток, Апоптические ядра, % ¹	Наличие анойкиза
биназа	560 ± 5	15 ± 5	+
Lys ²⁶ Ala	990 ± 10	7 ± 2	–
His ¹⁰¹ Glu	1240 ± 8	5 ± 2	–
без РНКазы	1260 ± 10	4 ± 1	–

¹ за 100 % принято общее число клеток (соответственно ядер) в чашке

Показано, что цитотоксическим действием на клетки A549 обладал фермент дикого типа, а также его мутантный вариант Lys²⁶Ala, при этом последний был менее токсичен и менее апоптогенен. Мутант с заменой в каталитическом центре His¹⁰¹Glu оказался нетоксичным и не вызывал превышения числа апоптических клеток по сравнению с необработанной культурой A549. Статистически достоверное повышение содержания низкомолекулярных фрагментов ДНК (размером менее 50Кб) в клетках A549, по сравнению с контролем без обработки ферментом, показано лишь для нативной биназы (500мкг/мл) после 72ч культивирования. При электрофорезе в агарозном геле детектировали характерную «лесенку» олигонуклеосомных фрагментов ДНК кратных по размеру примерно 0.18Кб. Генерации таких фрагментов предшествует образование фрагментов в 20-300Кб, являющееся ранним маркером апоптоза [Ioannou, Chen, 1996].

Приблизительно 15% инкубированных с биназой клеток содержат ядра, морфология которых характерна для поздних стадий апоптоза, в то время как в остальных вариантах опыта доля клеток, содержащих подобные апоптические ядра, не превышала 7%.

Обнаружена также тенденция к откреплению части клеток культуры A549 от монослоя при росте в присутствии 500мкг/мл биназы. Известно, что явление отсоединения эпителиальных клеток от матрикса характерен для особой формы их апоптоза – анойкиза [Frisch, 1999]. Охарактеризованный феномен служит дополнительным подтверждением индуцированных биназой апоптических изменений клеток карциномы A549.

Таким образом, установлено, что биназа для клеток солидных опухолей также является апоптогеном, но ее действие выражено слабее, чем по отношению к клеткам эритролейкоза. Поскольку мутанты со сниженной каталитической активностью не проявили ни токсического, ни апоптогенного действия в отношении культуры клеток A549, можно заключить, что уровень

каталитической активности, необходимый для повреждения клеток солидных опухолей, должен быть выше, чем для злокачественных клеток крови.

Оценка жизнеспособности клеточных культур при росте в присутствии микробных РНКаз

Исследование выживаемости клеточных культур, измеренное по изменению активности митохондриальных дегидрогеназ в тесте с WST-реагентом показало, что в порядке снижения величины токсического действия РНКаз можно расположить следующим образом: 7К → 5К → биназа → Lys²⁶Ala. Остальные из исследованных РНКаз не проявили токсических эффектов.

Прежде всего отмечено, что различные линии клеток обладают разной чувствительностью по отношению к цитотоксическим РНКазам. Как представлено на рис. 5 для биназы, фибробласты, трансформированные *ras*-онкогеном, оказались более чувствительны к действию фермента. Это согласуется с данными литературы для цитотоксических мутантов РНКазы Sa [Ilinskaya *et al.*, 2002] и онконазы [Iordanov *et al.*, 2000].

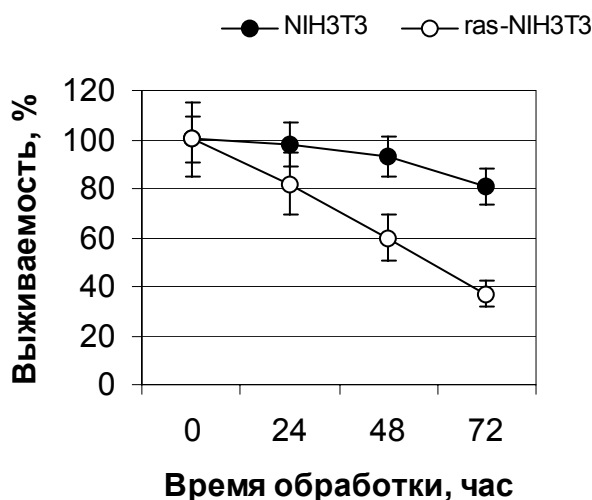


Рис. 5. Влияние времени культивирования фибробластов в присутствии биназы (300 мкг/мл) на их жизнеспособность.

Действие биназы на клетки эмбриональной почки, не содержащие искусственно внесенные кальций-зависимые калиевые каналы (HEK CV), также оказалось более выраженным (рис. 6). Для цитотоксичных мутантов 5К и 7К этот эффект уже был продемонстрирован ранее, и было сделано заключение, что этот тип ионных каналов вносит вклад в преодоление цитотоксического действия РНКаз [Ilinskaya *et al.*, 2004]. Можно сказать, что к настоящему времени, кроме непосредственно клеточной РНК, выявлены некоторые мишени опосредованной цитотоксической активности РНКаз, а

именно онкоген *ras* (усиление цитотоксичности в клетках, его экспрессирующих) и кальций-зависимые калиевые каналы (снижение цитотоксичности в клетках с нормальной функциональной активностью этих ионных каналов).

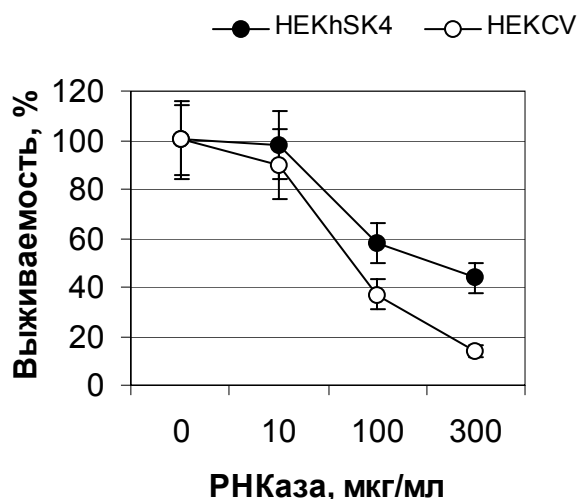


Рис. 6. Снижение выживаемости клеток эмбриональной почки под действием возрастающих концентраций биназы (72ч культивирования).

Как видно из рис. 5, 6 увеличение времени инкубирования в присутствии РНКазы и увеличение ее концентрации усиливают цитотоксический эффект фермента. Таким образом, мы показали, что токсическое действие бактериальных РНКаз имеет универсальные механизмы реализации, независимо от микроорганизма, из которого выделены эти РНКазы и различий в характеристиках чистых ферментов. В целом, для проявления цитотоксичности бактериальная РНКаза должна обладать значительными катионными свойствами и сохранять определенный уровень каталитической активности. Снижение уровня рибонуклеолитической активности ниже порогового значения, как это происходит у мутанта His¹⁰¹Glu, приводит к исчезновению цитотоксичности. Промежуточное значение каталитической активности у мутанта Lys²⁶Ala сопряжено с промежуточным значением угнетения выживаемости клеток (рис. 7).

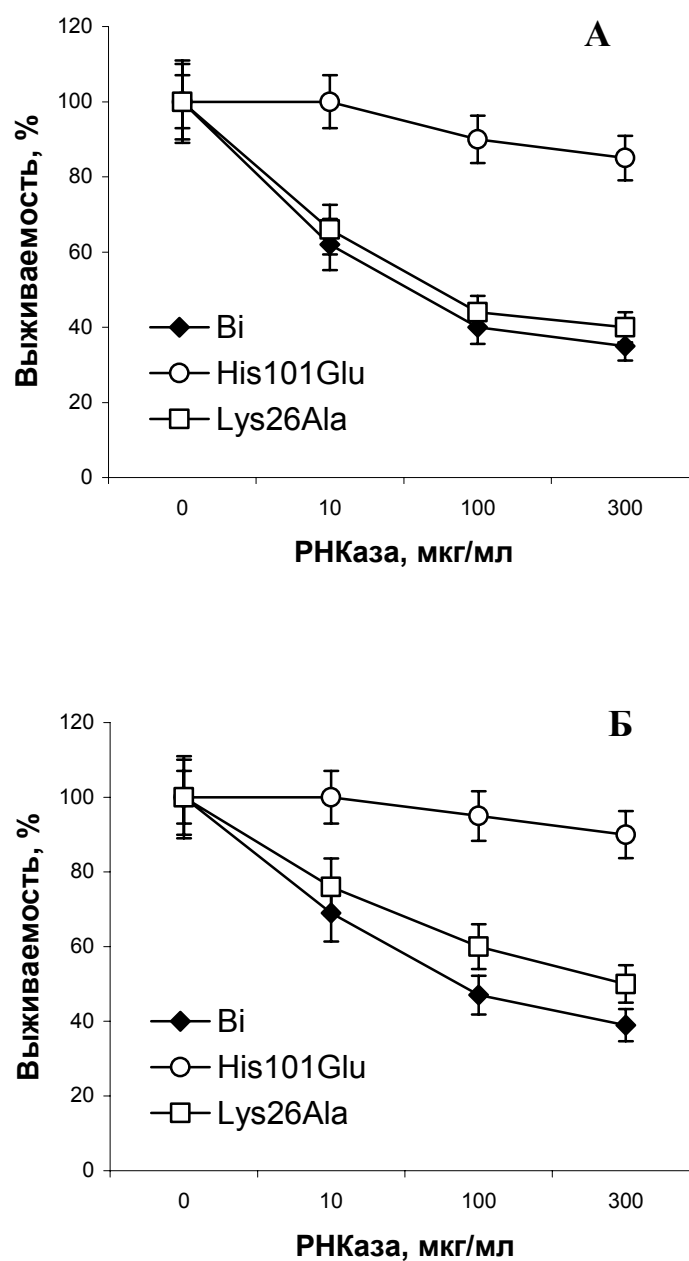


Рис. 7. Снижение выживаемости клеток эмбриональной почки линий НЕК (А) и НЕКhSK4 (Б) под действием биназы и ее мутантов с пониженной каталитической активностью Lys²⁶Ala и His¹⁰¹Glu (72ч культивирования).

Апоптотические изменения морфологических и физиологических характеристик клеток под действием бактериальных рибонуклеаз

На основе данных, полученных в тестах на микроорганизмах и по угнетению роста культур клеток эукариот, мы выбрали в качестве потенциальных индукторов апоптоза для микроскопического анализа РНКазы с выраженным токсическим действием, а именно, биназу, ее мутант Lys²⁶Ala и мутанты РНКазы Sa 5К и 7К.

Принципиальных различий в морфологических и физиологических изменениях клеток при действии различных цитотоксических бактериальных РНКаз не выявлено. При культивации клеток HEKhSK4 с ферментами (500мкг/мл) в течение 48ч происходят типичные морфологические апоптотические изменения: вакуолизация цитоплазмы, изменение формы клетки и образование пузырчатых выростов на поверхности клетки [Самуилов с соавт., 2000]. Зафиксирована аналогичная, но более слабо выраженная картина действия РНКаз на онкотрансформированные фибробласты мышей *ras*-NIH3T3. Окраска по методу Папенхайма клеток K562 позволила визуализировать тонкие аспекты апоптозиндуцирующего действия фермента, выражающиеся в конденсации хроматина. Кроме того, зафиксировано образование клетками других типичных морфологических маркеров апоптотических процессов – пузырчатых выростов и апоптотических телец (рис.2).

Окраска флуорохромными красителями позволила выявить особые изменения не только морфологических, но и физиологических характеристик клеток в культуре под действием фермента, которые также свидетельствуют об апоптогенных эффектах биназы. Так, при окрашивании флуорохромным красителем FURA-2 клеток HEKhSK4, подвергнутых воздействию фермента в течение 36ч в концентрации 300мкг/мл, установлено, что биназа вызывает повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . С увеличением времени воздействия биназы до 72ч внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} еще больше возрастает. При этом за 36ч не происходит явных апоптотических изменений; они зафиксированы нами только спустя 48ч роста клеток в присутствии РНКазы. Таким образом, можно заключить, что повышение концентрации внутриклеточного кальция является ранним маркером последующих апоптотических изменений. Апоптоз зафиксирован нами также по другому известному маркеру – падению мембранного потенциала митохондрий, мембрана которых в процессе апоптоза становится более проницаемой для ионов.

Необходимо отметить, что все полученные нами данные, касающиеся визуализации апоптотической гибели клеток при воздействии цитотоксических бактериальных РНКаз, свидетельствуют о одновременном вовлечении клеток популяции в процессы программируемой клеточной смерти. Эти факты позволяют сделать вывод, что в гетерогенной популяции существует различные по чувствительности к действию цитотоксического агента субпопуляции.

Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* как индуктор поликлонального Т-клеточного ответа

Установлено, что биназа в исследованном диапазоне доз (6-750мкг/мл) не вызывала экспрессии CD69 антигена и синтеза γ -интерферона Т-клетками.

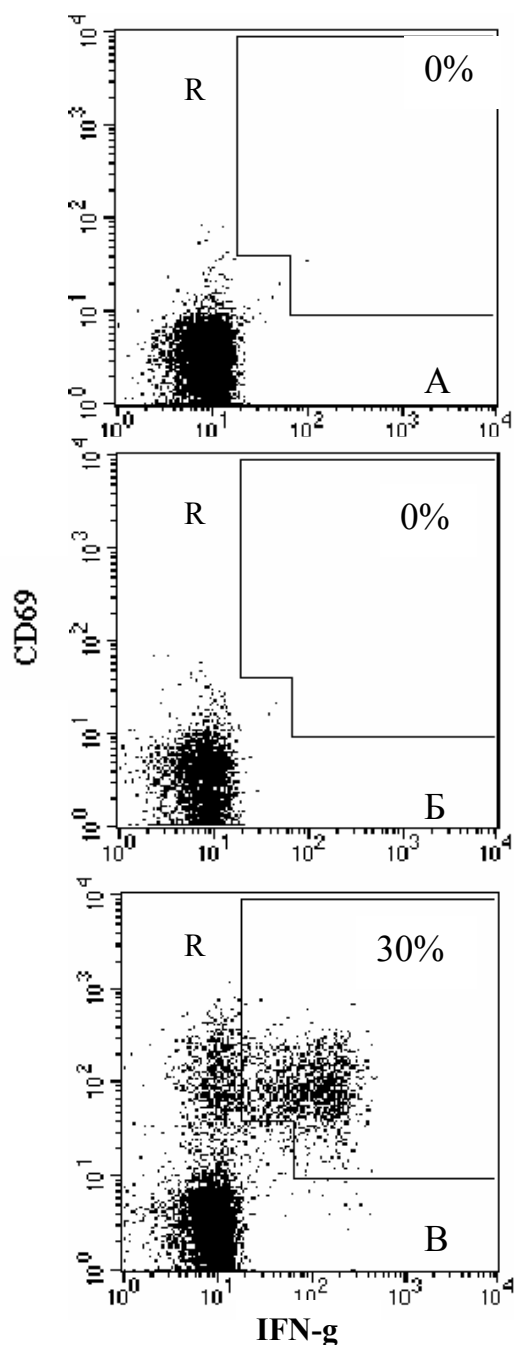


Рис. 8. Индукция экспрессии активационных маркеров CD69 и IFN-g популяцией CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов под действием биназы (16ч). Регион R характеризует долю клеток (%) с высоким уровнем экспрессии IFN-g и CD69 по отношению к общему числу CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитов, отобранных путем поэтапного гейтинга из популяции мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров. А – контрольные необработанные клетки, В – обработка биназой (750мкг/мл), С - стафилококковый энтеротоксин Б (100нг/мл).

В присутствии СЭБ у 30% CD4+, CD8+ лимфоцитов происходило образование γ -интерферона и CD69 (рис. 8).

Таким образом, по отсутствию у биназы возможности активировать CD4+ и CD8+ Т-клетки можно сделать вывод, что фермент не обладает свойствами суперантигена - индуктора поликлонального Т-клеточного ответа. Данные, характеризующие бактериальную РНКазу как неиммуногенную, имеют принципиальное значение для обоснования отсутствия у нее свойств, обуславливающих реакции гиперчувствительности. Такие реакции представляют собой наиболее опасный для жизни пациента, хотя и редкий тип иммунного ответа и описаны для ряда белков микробного происхождения.

Обобщая полученные результаты, можно сделать следующее заключение. Наши исследования показали, что среди микробных РНКаз высокотоксичными оказались ферменты с достаточным уровнем каталитической активности: биназа, ее мутант Lys²⁶Ala, и катионные мутанты РНКазы Sa – 5К и 7К. Оказалось, что только те молекулы каталитически активных РНКаз, которые несут положительный заряд, способны к индукции токсических, генотоксических и апоптических эффектов. Ряд авторов ранее отмечал роль положительного заряда в цитотоксичности, при этом молекула РНКазы может быть катионной по природе, то есть как дикий тип фермента (онконаза [Saxena *et al.*, 2003]), либо модифицированной генно-инженерным путем [Ilinskaya *et al.*, 2002] или путем химической модификации [Futami *et al.*, 2002].

Главной мишенью действия РНКаз несомненно является РНК, многообразие форм которой охватывает как связанные с белками РНК (рибосомные, информационные, РНК в составе рибонуклеопротеинов - сигнал-узнающих частиц, так и не связанные с белками транспортные РНК, малые интерферирующие и некодирующие микроРНК [McManus, Sharp, 2002; McManus, 2003]. На сегодня одним из особенно привлекательных предположений является возможное участие РНКаз в регуляции процессов РНК-интерференции.

Наш вклад в расшифровку механизмов действия бактериальных РНКаз заключается в подтверждении роли клеточных мишеней, таких, как онкоген *ras* и кальций-зависимых калиевых каналов, в реализации токсических эффектов РНКаз. Нами осуществлена прямая регистрация апоптических изменений ряда клеток при действии цитотоксических бактериальных РНКаз, а также непосредственно в живых клетках, обработанных ими, зафиксировано возрастание концентрации внутриклеточного кальция.

С другой стороны, нами показано, что токсические, генотоксические и апоптогенные эффекты бактериальных РНКаз детерминированы главным

образом катионными и каталитическими свойствами. Для проявления ферментом цитотоксичности он должен сохранять определенный уровень рибонуклеолитической активности и обладать положительным зарядом молекулы. Вероятно, именно катионность обуславливает избирательность действия исследованных ферментов по отношению к злокачественным клеткам, как это показано нами для биназы и ее мутанта Lys²⁶Ala на нормальных и малигнизированных клетках крови. Это связано с более высоким содержанием кислых гликолипидов и гликопротеинов на внешней поверхности клеточных мембран опухолевых клеток [Ran *et al.*, 2002].

Поскольку в популяции CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцитов крови человека биназа не стимулирует экспрессию активационных маркеров CD69 и γ -интерферона, можно считать, что у биназы отсутствуют свойства индуктора поликлонального Т-клеточного ответа. Отчасти наш вывод подтверждается данными литературы об отсутствии иммуногенности фермента при однократном введении опытным животным [Куриненко, 1991]. Данные, полученные нами при изучении потенциальной иммуногенности биназы в цитотоксических концентрациях, индуцирующих апоптоз, определенно имеют практическое значение, еще раз подтверждающее реальную возможность разработки противоопухолевых препаратов на основе бактериальных РНКаз.

Результаты наших исследований позволяют считать катионные каталитически активные бактериальные РНКазы перспективными для создания новых средств щадящей противоопухолевой терапии, альтернативных классическим ДНК-повреждающим агентам, обладающим невысокой селективностью действия.

ВЫВОДЫ

1. Биназа и ее мутантные варианты Lys²⁶Ala и His¹⁰¹Glu с пониженной каталитической активностью нетоксичны для тестерных штаммов грамотрицательных (*Salmonella thyphimurium*) и грамположительных (*Bacillus subtilis*) бактерий. Среди РНКаз *Streptomyces aureofaciens* токсичностью в отношении тестерного штамма *Escherichia coli* обладают лишь катионные варианты 5К и 7К, обладающие увеличенным по сравнению с ферментом дикого типа зарядом молекул.
2. У РНКазы Sa и ее мутантов 3NQ, 5NQ с частично нейтрализованным отрицательным зарядом молекулы и мутантов с дополнительным терминальным положительным зарядом Sa^CG₂K₂, K₂^NSa, K₂^N5NQ гентоксические свойства не обнаружены. Генотоксичностью, определенной

по способности индуцировать SOS-ответ клетки, обладают только мутанты РНКазы Sa с увеличенной катионностью – 5К и 7К.

3. Апоптозиндуцирующие свойства продемонстрированы для катионных мутантов РНКазы Sa 5К, 7К, биназы и ее мутанта Lys²⁶Ala с пониженной каталитической активностью. Зафиксированы морфологические изменения клеток под действием бактериальных РНКаз: конденсация хроматина, вакуолизация цитоплазмы, образование пузырчатых выростов мембран, апоптических телец, а также физиологические изменения: повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ и падение мембранного потенциала митохондрий обработанных РНКазами клеток.

4. Установлено, что биназа и ее каталитически активный мутант Lys²⁶Ala обладают селективным апоптозиндуцирующим действием в отношении клеток миелоидного лейкоза K562, ингибируя пролиферацию и вызывая апоптоз злокачественных клеток, в отличие от лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Обнаружено, что уровень каталитической активности, необходимый для индукции апоптоза клеток солидных опухолей, выше, чем таковой для злокачественных клеток крови.

5. В популяции CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцитов крови человека РНКазы *Bacillus intermedius* не стимулирует экспрессию активационных маркеров CD69 и γ-интерферона, что указывает на отсутствие у биназы свойств индуктора поликлонального Т-клеточного ответа.

6. Токсические, генотоксические и апоптогенные эффекты бактериальных РНКаз детерминированы главным образом катионными и каталитическими свойствами. Для проявления ферментом цитотоксичности он должен сохранять определенный уровень рибонуклеолитической активности и обладать положительным зарядом молекулы.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Зеленихин П.В. Индукция апоптоза опухолевых клеток биназой / П.В. Зеленихин, А.И. Колпаков, Г.В. Черепнев, О.Н. Ильинская // Молекулярная биология.- 2005.- Т.39.- №3.- С.457-463.
2. Зеленихин П.В. Апоптогенные и иммуногенные свойства рибонуклеазы *Bacillus intermedius* / П.В. Зеленихин, Г.В. Черепнев, О.Н. Ильинская // Ученые записки Казанского государственного университета, сер. «Естественные науки».- 2005.- Т.147.- кн.2.- С.80-88.
3. Зеленихин П.В. Биназа не индуцирует поликлональный Т-клеточный ответ / П.В. Зеленихин, Г.В. Черепнев, Ф. Керн, О.Н. Ильинская // Доклады Академии Наук.- 2006.- Т.407.- №3.
4. Зеленихин П.В. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* как индуктор апоптоза клеток миелоидного лейкоза / П.В. Зеленихин, О.Н. Ильинская, Г.В. Черепнев, Ф. Керн // XIII международная научная конференция «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». Тезисы докладов.- Казань.- 4-8 апреля 2005 г. –С.34-35.
5. Пельникович А.Д. Апоптогенные и иммуногенные свойства рибонуклеазы *Bacillus intermedius* / А.Д. Пельникович, П.В. Зеленихин // 79-ая всероссийская студенческая научная конференция, посвященная 1000-летию Казани. Тезисы докладов.- Казань.- 12-14 апреля 2005 г.- С.69-70.
6. Зеленихин П.В. Индукция апоптоза рибонуклеазой *Bacillus intermedius* в клетках миелоидного лейкоза человека / П.В. Зеленихин // 9-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века. Тезисы докладов.- Пущино.- 18-22 апреля 2005 г.- С.24.
7. Зеленихин П.В. Индукция SOS-ответа рибонуклеазой *Streptomyces aureofaciens* и ее мутантами с различными катионными свойствами / П.В. Зеленихин, О.Н. Ильинская // V конференция Научно-образовательного Центра КГУ «Материалы и технологии XXI века». Тезисы докладов.- Казань: КГУ.- 26-27 апреля 2005 г. -С.45.
8. Зеленихин П.В. Индукция апоптоза и неспецифического иммунного ответа бактериальной РНКазой (биназой) / П.В. Зеленихин, Г.В. Черепнев, Ф. Керн, О.Н. Ильинская // VI международная конференция «Проблемы загрязнения окружающей среды - 2005». Тезисы докладов, Пермь-Казань-Пермь.- 20-25 сентября 2005 г. -С.66.